

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

2016 г.

Регистрационный № 256-1215



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПСОРИАТИЧЕСКОГО
АРТРИТА ПО СЫВОРОТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АРГИНАЗЫ I**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы
народов медицинский университет»

АВТОРЫ: Сергиевич А.В.

д.м.н., профессор Литвяков А.М.

Витебск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) представлен метод определения активности псориатического артрита по сывороточной концентрации аргиназы I, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на профилактику осложнений, развивающихся при высокой активности псориатического артрита (суммарной активности псориатического поражения кожного покрова и суставов). Применение данного метода позволит более эффективно выявлять пациентов, нуждающихся в динамическом наблюдении и/или коррекции лечения, и позволит оценивать риск прогрессирования атеросклероза у пациентов с псориатическим артритом. Это позволит снизить длительность временной нетрудоспособности, сроки госпитализации и инвалидизацию пациентов.

Инструкция предназначена для врачей-ревматологов, врачей-дерматологов учреждений здравоохранения областного и республиканского уровня.

Перечень медицинских изделий, лекарственных средств, реактивов и т.д.

1. Набор для определения сывороточной концентрации аргиназы I.
 - 1.1. Антитела, покрывающие микротитровальные стрипы планшета.
 - 1.2. Конъюгат раствор.
 - 1.3. Растворитель для стандарта.
 - 1.4. Буфер разбавления.
 - 1.5. Раствор субстрата.
 - 1.6. Стоп раствор.
 - 1.7. Мастер стандарт человеческой аргиназы.
 - 1.8. Контроль качества (высоко, низко).

- 1.9. Концентрат промывочного раствора (10х).
2. Деионизированная вода.
3. Пробирки для разведения образцов.
4. Цилиндры для разведения промывочного раствора и разведения буфера.
5. Пипетки объемом 10-1000 мкл (вари).
6. Унипипетка на 100 мкл.
7. Одноразовые наконечники.
8. Абсорбирующий материал для опрокидывания планшет после промывки.
9. Вортекс для перемешивания растворов.
10. Шейкер для ИФА.
11. Восьмиканальная пипетка 50-300 мкл.
12. Микропланшеточный ридер с длиной волны 450 нм.
13. Центрифуги лабораторные.
14. Пробирки конические центрифужные.

Показания к применению

Псориатический артрит.

Противопоказания к применению

Противопоказаний к применению нет.

Описание технологии использования метода с указанием этапов

1. Определяют сывороточную концентрацию аргиназы I (нг/мл).
- 1.1. Подготовка реактивов. Все реактивы должны быть комнатной температуры к началу использования. Реактивы, входящие в состав набора и готовые к использованию: антитела, покрывающие

микротитровальные стрипы планшета; конъюгат раствор; растворитель для стандарта; буфер разбавления; раствор субстрата; стоп раствор. Реактивы, входящие в состав раствора в концентрированной или лиофилизированной форме: мастер стандарт человеческой аргиназы; контроль качества (высоко, низко); концентрат промывочного раствора.

1.1.1. Разводят лиофилизированный мастер стандарт со 180 μ l деионизированной воды для проведения исследования. Растворяют в течение 15 минут и полностью перемешивают. Итоговая концентрация человеческой аргиназы в готовом растворе составляет 320 нг/мл (0,032% раствор). Готовят набор стандартов, используя растворитель для стандартов, как показано в таблице 1.

Таблица 1 – Набор стандартов

| Объем стандарта | Растворитель для стандарта | Концентрация |
|----------------------|----------------------------|--------------|
| | | 320 нг/мл |
| 75 μ l 320 нг/мл | 75 μ l | 160 нг/мл |
| 75 μ l 160 нг/мл | 75 μ l | 80 нг/мл |
| 75 μ l 80 нг/мл | 75 μ l | 40 нг/мл |
| 75 μ l 40 нг/мл | 75 μ l | 20 нг/мл |
| 75 μ l 20 нг/мл | 75 μ l | 10 нг/мл |
| 75 μ l 10 нг/мл | 75 μ l | 5 нг/мл |

Разводят подготовленные стандарты четырехкратно с буфером разбавления для проведения исследования, например 60 μ l стандарта + 180 μ l буфера разбавления для дубликатов. Приготовленные стандарты используют в ELISA в течение 30 минут, т.е. готовят непосредственно перед внесением в планшеты.

1.1.2. Разводят каждый контроль качества (высоко и низко) с 60 μ l деионизируемой воды для проведения исследования. Растворяют в

течение 15 минут и полностью перемешивают. Разводят контроль качества четырехкратно с буфером разбавления для проведения исследования, например 60 μ l контроля + 180 μ l буфера разбавления для дубликатов.

1.1.3. Разводят концентрат промывочного раствора (10x) десятикратно в деионизированной воде для приготовления раствора, например 100 мл концентрата промывочного раствора (10x) + 900 мл деионизируемой воды.

1.2. Подготовка образцов. После забора крови центрифугируют ее немедленно (в пределах нескольких секунд). Пробирку с кровью центрифугируют при 1000 об/мин 10 минут (200g). Следы гемолиза и загрязнение сыворотки эритроцитами вызывают ложные завышенные результаты определения аргиназы I. При разбавлении сыворотку хорошо перемешивают на вортексе без вспенивания. Образцы немедленно исследуют или хранят при -20°C либо, предпочтительно, при -70°C (тогда годны к использованию по крайней мере 1 год). Полностью перемешивают размороженные образцы только для проведения исследования. При исследовании не используют гемолизированные или липемические образцы.

1.3. Процедура проведения исследования.

1.3.1. Раскапывают 100 μ l разбавленных стандартов, контролей качества, буфера разбавления (=Blank) и образцов, предпочтительно в дубликатах, в соответствующие лунки. Инкубируют пластину при комнатной температуре (25°C) в течение 1 часа на шейкере при 300 об/мин.

1.3.2. Промывают лунки трехкратно с промывочным раствором (0,35 мл в лунку). После заключительного мытья, опрокидывают и прижимают пластинку к абсорбирующему материалу – фильтровальная бумага.

1.3.3. Добавляют по 100 μ l конъюгат раствора в каждую лунку.

1.3.4. Инкубируют пластину при комнатной температуре (25°C) в течение 1 часа на шейкере при 300 об/мин.

1.3.5. Промывают лунки трехкратно с промывочным раствором (0,35 мл в лунку). После заключительного мытья, опрокидывают и сильно прижимают пластинку к абсорбирующему материалу – фильтровальная бумага.

1.3.6. Добавляют 100 μ l раствора субстрата в каждую лунку. Инкубируют планшет в темноте в течение 10 минут при комнатной температуре (25°C) без вспенивания.

1.3.7. Останавливают реакцию добавлением 100 μ l стоп раствора.

1.3.8. На микропланшеточном ридере с длиной волны 450 нм определяют поглощение света в течение 5 минут после остановки реакции при рабочей длине волны 450 нм с использованием фоновой длины волны 620 нм.

1.4. Вычисления. По данным концентрации и оптической плотности стандартов строится калибровочная кривая (логарифм среднего поглощения света (оптическая плотность) изображается против известной концентрации стандартов (нг/мл)) и высчитывается концентрация образцов.

2. На основании полученных результатов исследования делают вывод об активности псориатического артрита. При значении сывороточной концентрации аргиназы I меньше или равной 200 нг/мл – умеренная активность псориатического артрита (суммарная активность псориатического поражения кожного покрова и суставов); больше 200 нг/мл – высокая активность псориатического артрита (суммарная активность псориатического поражения кожного покрова и суставов).

Интерпретация результатов исследования

Критерий высокой активности псориатического артрита:

- сывороточная концентрация аргиназы I больше 200 нг/мл.

Критерий умеренной активности псориатического артрита:

- сывороточная концентрация аргиназы I меньше или равна 200 нг/мл.

Возможные осложнения и ошибки

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано.

Ошибки возможны при:

1. Нарушении длительности и (или) условий хранения сыворотки крови, компонентов набора.
2. Нарушении методики исследования.
3. Использовании сыворотки крови со следами гемолиза или загрязненной эритроцитами, липемической сыворотки крови.